

МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БІОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

УДК 577.27

АВИДНОСТЬ IgG АНТИТЕЛ И ЕЕ ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА

С. А. БОБРОВНИК

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: s-bobrov@bk.ru*

Предложен новый способ оценки avidности двухвалентных антител при их взаимодействии с двухвалентным антигеном. Теория основана на идее, высказанной нами ранее, относительно взаимосвязи между константами аффинности для бимолекулярной и мономолекулярной реакции для одних и тех же реагентов в зависимости от того связаны они или не связаны гибким линкером. Использование предложенной нами теории позволяет рассчитать avidность взаимодействия двухвалентных антител, если известна аффинность антител и их молекулярная структура. Полученные нами теоретические результаты полностью совпадают с экспериментальными оценками avidности, известными из литературы.

Ключевые слова: аффинность, avidность, антитело, антиген.

Под аффинностью антител подразумевают аффинность взаимодействия моновалентного фрагмента антител с соответствующей антигенной детерминантой. В некоторых случаях эту аффинность называют также истинной аффинностью [1] или же внутренней аффинностью (intrinsic affinity) антител [2]. Для измерения аффинности антител предложено много различных методов [3–7], в том числе и нами [8–12], и экспериментальное измерение аффинности антител в большинстве случаев не представляет никакой сложности.

Известно однако, что антитела IgG являются двухвалентными, антитела IgA двух- или четырехвалентными, а антитела IgM десятивалентными. Мультисайтовое связывание антител с поливалентным антигеном является намного более прочным, чем моновалентное связывание. Для количественной оценки эффективности поливалентного связывания антител используют так называемую «функциональную аффинность» антител [2], которую называют также «кажущейся аффинностью», «наблюдаемой аффинностью», «эффективной аффинностью» или же «avidностью» [13]. В настоящей работе мы для краткости будем употреблять термин «avidность антител».

В отличие от аффинности процесса взаимодействия антител с соответствующим анти-

геном оценить avidность антител в отношении поливалентного антигена намного сложнее теоретически и в эксперименте. В литературе описаны различные подходы для оценки avidности антител, причем как теоретические, так и экспериментальные [1, 2, 13–16]. Тем не менее можно с полным основанием утверждать, что этот вопрос полностью не решен до сих пор, в результате чего в последнее время появились даже сомнения в том, имеет ли смысл использовать для характеристики антител такой параметр, как avidность [13, 17–19].

В связи с этим нами предпринята попытка представить свое видение теоретического решения этой проблемы, которое основано на опубликованной нами ранее идее о зависимости аффинности взаимодействия между рецептором и соответствующим лигандом от того, связаны ли эти реагенты гибкой нитью определенной длины [20]. Предложенная нами теория и сделанные на ее основе теоретические расчеты avidности двухвалентных IgG антител представлены в настоящей статье.

Результаты и их обсуждение

1. Особенности взаимодействия рецептора и лиганда, когда они связаны гибкой нитью. Для того чтобы приступить к решению стоящей перед нами задачи, а именно, теоретической оценке avidности двухвалентных антител,

вначале имеет смысл рассмотреть решение более простой проблемы. Пусть в определенном растворе имеется некий моновалентный рецептор **A**, способный обратимо связывать соответствующий лиганд **B** с образованием комплекса **C**, причем аффинность этого взаимодействия равна K_{bi} .



Это значит, что в соответствии с законом действующих масс:

$$K_{bi} = \frac{c}{(a-c)(b-c)}, \quad (2)$$

где c — концентрация лиганд-рецепторного комплекса после достижения состояния равновесия между свободными и связанными реагентами, a — полная концентрация рецептора, b — полная концентрация лиганда. Тогда, $(a-c)$ — концентрация свободного рецептора, а $(b-c)$ — концентрация свободного лиганда после достижения состояния равновесия.

А теперь представим, что те же рецептор и лиганд соединены очень гибкой нитью, длина которой равна r , причем эта нить совершенно не мешает данным реагентам как обычно двигаться в растворе и образовывать обычную связь между собой, но не позволяет лиганду удалиться от рецептора на расстояние больше, чем длина r . Спрашивается, как этот воображаемый абсолютно гибкий линкер длиной r повлияет на кинетику связывания рецептора с лигандом, а значит и на константу равновесия (т.е. на аффинность взаимодействия) данной реакции?

Очевидно, что невозможность лиганда удалиться от рецептора на расстояние большее, чем r , можно рассматривать, как аналог того, что оба эти реагента находятся в данном растворе в изолированной сфере (рис. 1), радиус которой равен r . Тогда легко найти объем этой сферы:

$$V = \frac{4\pi r^3}{3}. \quad (3)$$

Зная, что в данном объеме V находится всего лишь одна молекула рецептора и одна лиганда, легко найти, сколько таких пар реагентов могло бы находиться в одном литре, т.е. вычислить их кажущуюся концентрацию относительно друг друга. Пусть длина r измеряется в нанометрах, тогда объем данной сферы также удобно вычислять в нм^3 . Поскольку в одном литре находится 10^{24} нм^3 , то таких сфер

объемом $V \text{ нм}^3$ будет $\frac{3 \times 10^{24}}{4\pi r^3}$, а значит именно

такое количество молекул рецептора и лиганда находится в одном литре раствора. Разделив эту величину на число Авогадро $N = 6 \times 10^{23}$, получим, что относительная концентрация a в молях данных рецептора и лиганда, если они связаны гибким линкером длиной r , будет равна:

$$a = \frac{3 \times 10^{24}}{4\pi r^3 \times 6 \times 10^{23}} \text{ М} = \frac{5}{4\pi r^3} \text{ М}. \quad (4)$$

Отметим, что ранее нами уже рассматривалась эта задача [20], но тогда вместо длины радиуса сферы r была ошибочно взята длина диаметра этой сферы и по этой причине найденное нами значение объема сферы было в 8 раз меньше, и, соответственно, найденное значение концентрации r было в 8 раз больше истинного.

Очевидно, что в одном литре исследуемого раствора может находиться всего несколько молекул рецептора и лиганда (или даже только одна молекула), связанных коротким гибким линкером, длина которого равна r . Однако их кажущаяся концентрация относительно друг друга будет не исчезающе малой, а огромной, равной a , величину которой можно найти с помощью уравнения (4). Соответственно значительно возрастает вероятность столкновения реакционноспособных молекул **A** и **B** и, как следствие, соответственно значительно увеличивается вероятность образования их комплекса **C**. Отметим, что во многих работах такая относительно друг друга концентрация a данных реагентов называется эффективной концентрацией или эффективной молярностью [21–23]. Эта величина демонстрирует насколько сильно возрастает эффективность взаимодействия между рецептором и лигандом благодаря их связи с помощью гибкого линкера длиной r , если его длина невелика (например, находится в пределах 1–20 нм).

Итак, если рецептор и лиганд связаны гибкой нитью, то их кажущаяся концентрация относительно друг друга будет равна a , причем концентрация обоих реагентов должна быть одинаковой, т.е. $a = b$. Для того чтобы получить такую же эффективность взаимодействия того же рецептора **A** и лиганда **B**, но не связанных гибкой нитью, концентрацию обоих реагентов в растворе пришлось бы увеличить до величины a . При этом очевидно, что в соответствии с уравнением (2) для несвязанных нитью

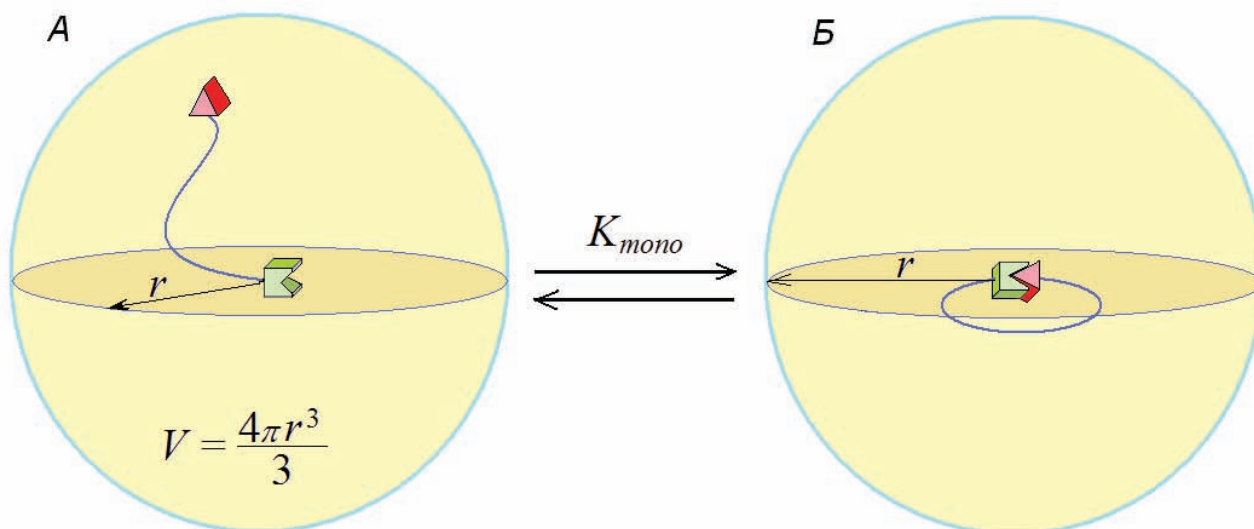


Рис. 1. Схема реакции обратимого связывания двух комплементарных макромолекул (рецептора и лиганда), связанных абсолютно гибкой цепью. Длина молекулы r равна сумме длин гибкого линкера и обеих макромолекул

реагентов, концентрация которых равна a , будет справедливо соотношение:

$$K_{bi} = \frac{c}{(a-c)(a-c)} = \frac{c}{(a-c)^2}, \quad (5)$$

где K_{bi} – константа равновесия связывания несвязанных линкером рецептора и лиганда.

Поскольку абсолютно гибкий линкер, согласно предположению, не влияет ни на процесс взаимодействия рецептора А с лигандом В, ни на диссоциацию образовавшегося комплекса С, то одинаковая концентрация комплекса c должна образоваться при достижении равновесия в обоих случаях, и тогда, когда реагенты свободны, и когда они связаны гибким линкером. Однако в последнем случае мы имеем дело не с бимолекулярной, а с внутримолекулярной реакцией, в которой связанные одной цепью лиганд и рецептор могут быть или объединены, в результате чего образуется молекулярное кольцо (рис. 1, Б), или же разъединены, и тогда мы имеем линейную молекулу (рис. 1, А). Поскольку, как мы выяснили выше, концентрация молекул, образовавших кольцо после достижения равновесия, также будет равна c , а концентрация всех имеющихся молекул равна a , то очевидно, что концентрация линейных молекул будет равна $a-c$.

Отсюда следует, что константа равновесия для такой внутримолекулярной реакции (когда А и В связаны гибким линкером) будет равна:

$$K_{mono} = \frac{c}{a-c}, \quad (6)$$

где K_{mono} – константа равновесия реакции взаимодействия рецептора и лиганда, связанных гибким линкером.

Следовательно, разделив уравнение (6) на уравнение (5), получим, что отношение K_{mono}/K_{bi} будет равно:

$$\frac{K_{mono}}{K_{bi}} = \frac{c}{a-c} : \frac{c}{(a-c)^2} = a-c \quad (7)$$

или

$$K_{mono} = K_{bi} \times (a-c). \quad (8)$$

Поскольку значение величины K_{bi} измеряется в M^{-1} , а величина $(a-c)$ измеряется в M , то очевидно, что значение K_{mono} – это безразмерная величина.

Важно отметить, что, зная величины r и K_{bi} , можно легко рассчитать не только величину a , используя уравнение (4), но и определить значение c , решив уравнение (5) относительно неизвестного c . Так, используя уравнение (5), получим, что концентрация комплекса рецептора с лигандом будет:

$$c = \frac{1 + 2aK_{bi} - \sqrt{1 + 4aK_{bi}}}{2K_{bi}}. \quad (9)$$

Таким образом, если известны значения r и K_{bi} , то отыскав c с помощью уравнения (4) величину a , а также вычислив величину c при помощи уравнения (9), можно затем найти c с помощью уравнения (8) значение K_{mono} для слу-

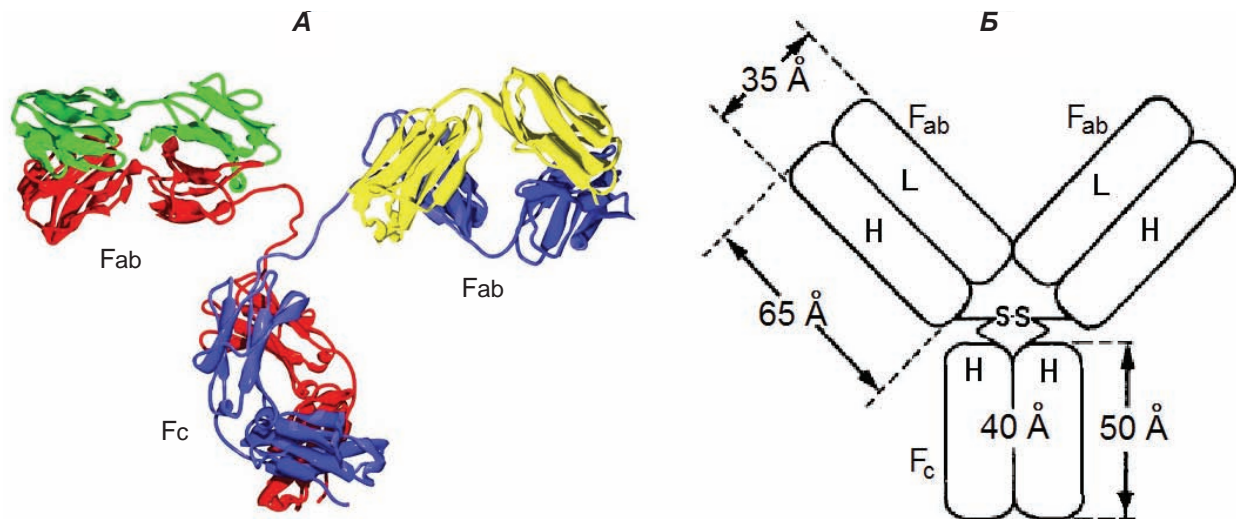


Рис. 2. Схема укладки полипептидных цепей (А) [24] и схема строения IgG молекулы (Б) [2]

чая, когда реагенты А и В связаны между собой гибким линкером.

2. *Взаимодействие двухвалентных антител IgG с двухвалентным антигеном.* Используя предложенную нами в предыдущем разделе теорию, рассмотрим теперь, как можно оценить avidность взаимодействия двухвалентных антител при их связывании с поливалентным антигеном. Для этого воспользуемся известной из литературы информацией о строении IgG антитела (рис. 2, А) [24] и размерах его фрагментов (рис. 2, Б) [2]. На рис. 2, А видно схему укладки полипептидных цепей в Fc и двух Fab-фрагментах, шарнирный участок антитела позволяет Fab-фрагментам свободно двигаться в пространстве относительно друг друга. На рис. 2, Б представлены схема строения IgG и размеры фрагментов антитела [2] из которого видно, что длина Fab-фрагментов равна около 6,5 нм, а гибкий шарнирный участок, судя по рис. 2, А, видимо имеет длину от 3,5 до 6,5 нм.

Исходя из этих данных, мы можем представить схему взаимодействия IgG антитела с двух- или поливалентным антигеном (рис. 3) и, следовательно, попытаться оценить avidность этого взаимодействия, используя предложенную нами теорию. Чтобы сделать это, нам вначале необходимо вычислить локальную концентрацию свободного Fab-фрагмента в части сферической области, где он может свободно двигаться, после того как первый Fab-фрагмент уже связался с одной из детерминант лиганда.

Поскольку в дальнейшем нам надо будет определять концентрацию молекул не только

в сферическом объеме, имеет смысл поиска способа определения концентрации молекулы в произвольном объеме V . Вычислить концентрацию одной молекулы, находящейся в объеме V , можно следующим образом. Если V измерен в нм^3 , то в одном литре находится $10^{24}/V$ таких объемов, а значит и такое же количество молекул. Следовательно, разделив значение $10^{24}/V$ на число Авогадро, равное примерно 6×10^{23} , получим концентрацию данной молекулы в молях. В этом случае получим, что концентрация:

$$c = (10^{24}/V):(6 \times 10^{23}) = \frac{5}{3 \times V} \text{ моль} \quad (10)$$

Теперь рассмотрим, в каком объеме может свободно двигаться не связавшийся с лигандом Fab-фрагмент IgG антитела (рис. 3) благодаря гибкости шарнирного участка. Очевидно, что в данном случае мы не можем рассматривать оба Fab-фрагмента, как гибкие нити. Наоборот, связавшийся с лигандом Fab-фрагмент можно рассматривать, как жесткий стержень, который не может изгибаться или вращаться вокруг своей оси. Если данный Fab-фрагмент расположен перпендикулярно к плоскости, то центр сферы, описываемой свободным Fab-фрагментом и шарнирным участком, находится на расстоянии длины этого фрагмента, т.е. $h = 6,5 \text{ нм}$.

Если связавшийся с лигандом Fab-фрагмент находится под углом α к данной плоскости, тогда центр сферы, в которой свободно движется второй Fab-фрагмент, будет находиться на расстоянии $6,5 \times \sin \alpha$ нм от поверхности лиганда (рис. 3). Видимо, в большинстве случаев,

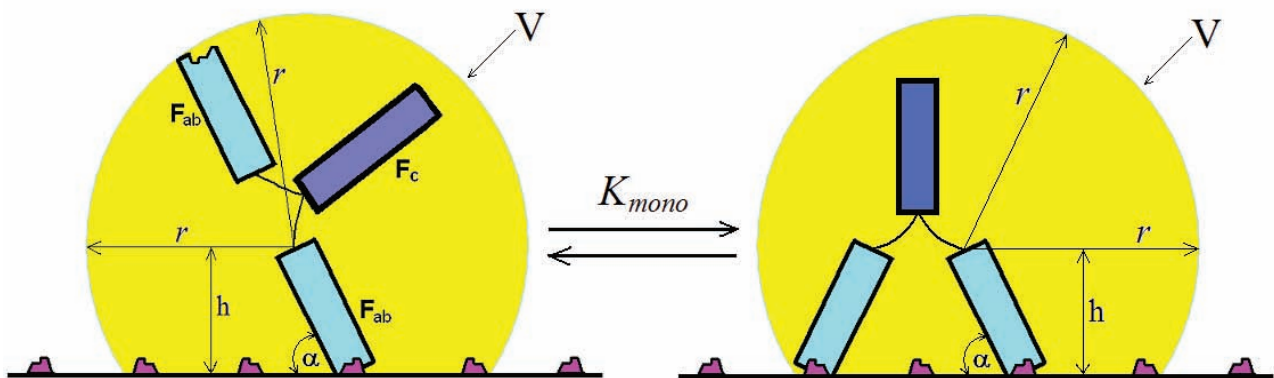


Рис. 3. Схема связывания двухвалентной IgG молекулы с антигенными детерминантами, расположенными на плоскости

этот угол не может быть меньше 60° и, следовательно, центр сферы не может быть ближе, чем $h = 6,5 \times \sin 60^\circ = 5,63$ нм. Исходя из этих соображений и используя предложенную нами теорию, мы можем теперь попытаться оценить avidность взаимодействия IgG антитела, если его аффинность связи с данным лигандом известна и равна, например, $K_{bi} = 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

Итак, рассмотрим вначале вариант, когда связавшийся с лигандом Fab-фрагмент расположен практически перпендикулярно к плоскости и следовательно расстояние центра сферы h , в которой может относительно свободно двигаться второй Fab-фрагмент, находится на расстоянии 6,5 нм от поверхности лиганда. Если за счет длины шарнирного участка радиус данной сферы увеличится на величину от 3,5 до 6,5 нм, то его длина будет равной от $r_1 = 6,5 + 3,5 = 10$ нм до $r_2 = 6,5 + 6,5 = 13$ нм. Тогда объем части сферы V , в которой свободно движется несвязанный Fab-фрагмент антитела, можно вычислить с помощью известной из тригонометрии формулы:

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3 - \frac{\pi(r-h)^2(2r+h)}{3} \quad (11)$$

Расчеты с помощью уравнения (11) показывают, что этот объем V_1 для $h = 6,5$ нм и радиуса $r_1 = 10$ нм равен $V_1 = 3848 \text{ нм}^3$, а искомый объем V_2 для радиуса $r_2 = 13$ нм равен $V_2 = 7765 \text{ нм}^3$.

Следовательно, согласно уравнению (10), локальная концентрация не связавшегося Fab-фрагмента по отношению к близлежащим детерминантам лиганда будет равна соответственно $a_1 = 4,330305 \times 10^{-4}$ и $a_2 = 2,146428 \times 10^{-4}$ М. Если в области движения свободного Fab-фрагмента имеется одна детерминанта лиганда, с кото-

рой этот свободный фрагмент может связаться, тогда с помощью уравнения (9) найдем, что $c_1 = 4,309545 \times 10^{-4}$ М, а $c_2 = 2,131827 \times 10^{-4}$ М для рассматриваемых случаев.

Тогда в первом случае $(a_1 - c_1) = 2,076 \times 10^{-6}$ М, а во втором случае $(a_2 - c_2) = 1,460 \times 10^{-6}$ М, откуда согласно уравнению (8) следует, что $K_{mono,1} = (1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}) \times (2,296 \times 10^{-6} \text{ M}) = 208$ или $K_{mono,2} = (1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}) \times (1,460 \times 10^{-6} \text{ M}) = 146$ для этих случаев. Напомним, найденные различия вычисленных значений связаны с тем, что в первом случае, предположительно, длина шарнирного участка IgG антитела равна 3,5 нм, а во втором случае – 6,5 нм. Теперь легко вычислить avidность взаимодействия IgG с поливалентным лигандом, которая, согласно уравнению (8), в первом случае равна $K = 208 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, а во втором случае $K = 146 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

Если прикрепившийся к лиганду один из Fab-фрагментов наклонен к плоскости под углом 60° , то центр части сферы, в которой может свободно перемещаться второй Fab-фрагмент, находится на расстоянии $6,5 \times \sin 60^\circ = 5,63$ нм от поверхности лиганда (см. выше). Это приведет к незначительному уменьшению этого объема и, следовательно, к небольшому увеличению локальной концентрации Fab-фрагмента. Для этого случая если $r_1 = 10$ нм то $V_1 = 3676 \text{ нм}^3$, если же $r_2 = 13$ нм, то $V_2 = 7403 \text{ нм}^3$. Проведя точно те же вычисления, что и выше, т.е. отыскав величины a и c , получим, что в первом случае avidность антител будет равна $K = 212 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, а во втором случае $K = 150 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Как видим, такой фактор, как угол наклона связавшегося с лигандом Fab-фрагмента очень мало влияет на avidность взаимодействия антитела и лиганда.

Из литературы известно, что так называемый «коэффициент усиления» (enhancement

factor) для двухвалентного связывания антител с поливалентным антигеном по сравнению с моновалентным связыванием Fab-фрагмента, т.е. отношение величины avidности взаимодействия данного антитела к его аффинности, чаще всего варьирует от 100 до 1000 раз, хотя в некоторых случаях он может быть еще выше [1, 15, 16].

Как видно из результатов проведенных нами вычислений, основанных на предложенной нами теории, именно такое усиление должно быть для двухвалентного связывания по сравнению с моновалентным, исходя из структуры и размеров двухвалентных IgG антител. Отметим также, что величина коэффициента усиления зависит и от аффинности антител, что следует из уравнения (8). Таким образом, полученные нами теоретические оценки avidности двухвалентных IgG антител хорошо согласуются с экспериментальными фактами, ранее известными из литературы [1, 15, 16].

АВІДНІСТЬ IgG АНТИТІЛ І ЇЇ ТЕОРЕТИЧНА ОЦІНКА

С. П. Бобровник

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;
e-mail: s-bobrov@bk.ru

Запропоновано новий метод оцінки avidності двовалентних антитіл у разі їхньої взаємодії з двовалентним антигеном. Теорія базується на ідеї, що була висловлена нами раніше, відносно взаємозв'язку між константами афінності біомолекулярної та мономолекулярної реакції для одних і тих самих реагентів в залежності від того, зв'язані вони чи ні гнучким лінкером. Використання запропонованої нами теорії дозволяє розрахувати avidність взаємодії двовалентних антитіл з двовалентним антигеном, якщо відома афінність антитіл і їхня молекулярна структура. Одержані нами теоретичні результати повністю збігаються з експериментальними оцінками avidності, відомими з літератури.

Ключові слова: афінність, avidність, антитіло, антиген.

AVIDITY OF IgG ANTIBODIES AND ITS THEORETICAL EVALUATION

S. A. Bobrovnik

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kiev;
e-mail: s-bobrov@bk.ru

Summary

A new method, which allows evaluation of the avidity of bivalent antibodies when they react with bivalent antigen, is suggested. The theory is based on the idea that was proposed by us earlier. That theory considered the relation between affinity constants for bi-molecular and mono-molecular reactions of the reagents, which either are connected or not connected by a flexible linker. Using the suggested theory it makes possible to calculate antibody avidity if the affinity and molecular structure of the antibody are known. The obtained by us theoretical results completely coincide with the experimental values of antibody avidity that are known from literature.

Key words: affinity, avidity, antibody, antigen.

1. Берзофски Д. А., Берковер А. Дж. Взаимодействие антиген-антитело / Иммунология. — 3. — Под ред. У. Пола. — М.: Мир, 1989. — С. 5–88.
2. Crothers D. M., Metzger H. // Immunochimistry. — 1972. — 3. — P. 341–357.
3. Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E. // J. Immunol. Methods. — 1985. — 77. — P. 305–319.
4. Stevens F. A. // Molec. Immunol. — 1987. — 24. — P. 1055–1060.
5. Lin S., Hsiao I. Y., Hsu S. M. // Anal. Biochem. — 1997. — 254. — P. 9–17.
6. Goldberg M. E., Djavadi-Ohanian L. A. // Curr. Opin. Immunol. — 1993. — 2. — P. 278–281.
7. Heinrich L., Tissot N., Hartmann D. J., Cohen R. // J. Immunol. Methods. — 2010. — 352. — P. 13–22.
8. Bobrovnik S. A. // Укр. біохім. журн. — 2000. — 72, № 3. — С. 133–141.
9. Bobrovnik S. A. // J. Biochem. Biophys. Methods. — 2003. — 57. — P. 213–236.

10. *Bobrovnik S. A.* // *Ibid.* – 2005. – **65**. – P. 30–44.
11. *Bobrovnik S. A., Komisarenko S. V., Ilyina L. V.* // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 2. – С. 170–174.
12. *Stevens F. J., Bobrovnik S. A.* // *J. Immunol. Methods.* – 2007. – **328**. – P. 53–58.
13. *Mattes M. J.* // *Ibid.* – 1997. – **202**. – P. 97–101.
14. *Hornick C. L., Karuch F.* // *Immunochemistry.* – 1972. – **9**. – P. 325–340.
15. *Karuch F.* // *Contemp. Top. Mol. Immunol.* – 1976. – **5**. – P. 217–228.
16. *Стьюард М.* Аффинность реакции антиген-антитело и ее биологическое значение / Структура и функции антител. – Под ред. Глинна Л., Стьюарда М. – М.: Мир, 1983. – С. 113–147.
17. *Ong G. L., Mattes M. J.* // *Mol. Immunol.* – 1993. – **30**. – P. 1455–1462.
18. *Mattes M. J.* // *Cancer Res.* – 1995. – **55**. (23 Suppl). – P. 5733s–5735s.
19. *Mattes M. J.* // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2005. – **54**. – P. 513–516.
20. *Бобровник С. А., Stevens F. J.* // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – **76**, № 6. – С. 127–129.
21. *Zhou H. X.* // *J. Mol. Biol.* – 2003. – **329**. – P. 1–8.
22. *Schleif R., Wolberger C.* // *Protein Sci.* – 2004. – **10**. – P. 2829–2831.
23. *Krishnamurthy V. M., Semetey V., Bracher P. J. et al.* // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – **129**. – P. 1312–1320.
24. *Harris L. J., Larson S. B., Hasel K. W., McPherson A.* // *Biochemistry.* – 1997. – **36**. – P. 1581–1597.

Получено 22.03.2010